

# **Rabbit Model for Germline Transmission**

**Rabbits injected with AAV-F.IX16 vector at doses ranging from  $1 \times 10^{11}$  vg/kg– $1 \times 10^{13}$  vg/kg**

**Semen collected at series of time points after injection, fractionated, DNA from total and fractions analyzed by PCR assay used to analyze human specimens**

# **Semen Collection**

## **Natural method**

**Artificial vagina**

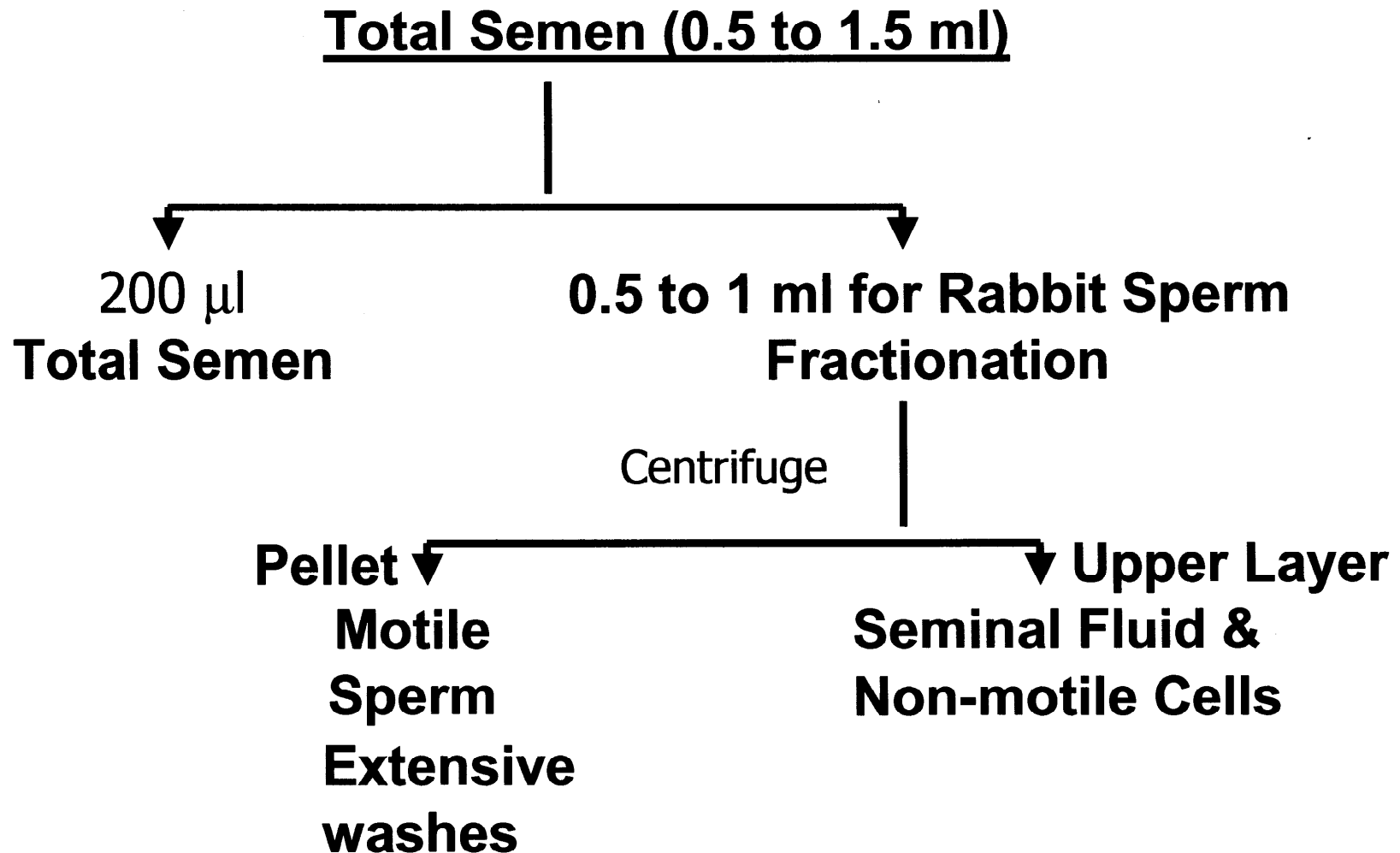
**Provides uncontaminated sample**

## **Disadvantages**

**Requires training of the male**

**Oestrous female**

# Semen Fractionation Method



# **PCR for Detection of Vector DNA Extraction from Semen**

**PCR ± Spike**



**Agarose Gel Electrophoresis**



**Southern blot of PCR product  
to confirm faint signal**

[Probe: 0.7kb Hind III fragment of rAAV from position 905 to 1631]

PCR product: position 790 to 1436 (647 bp)]

# **Groups of Injected Animals**

## **First cohort**

**n= 12 rabbits**

**5 months old, sexually mature but not experienced in semen collection (only later time points)**

## **Second cohort**

**n= 3 rabbits**

**18 months old and experienced  
semen samples collected weekly**

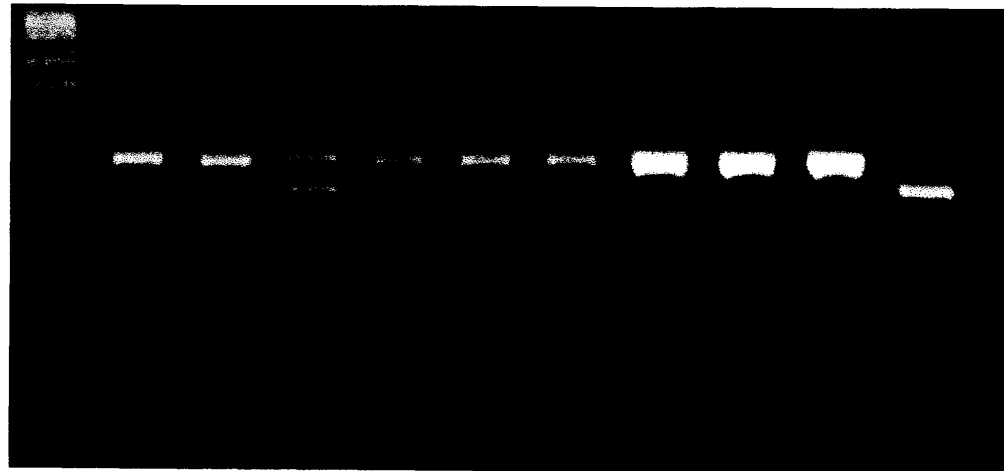
## **Third cohort**

**n= 12 rabbits**

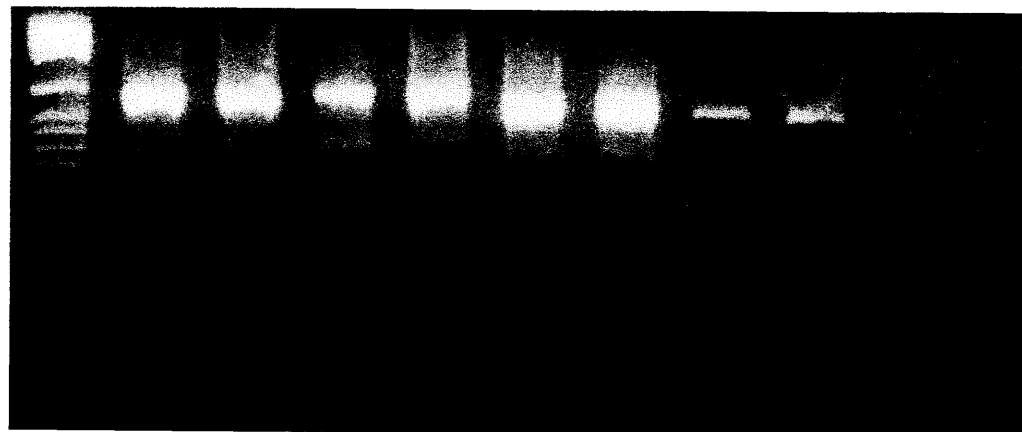
**median age of 20 months (retired breeders)**

# Vector Sequences Detected in Serum 24hrs Post-Injection

**M**   **LD**   **MD**   **HD**   **Water**



**M**   **LDIII**   **MDIII**   **HDIII**   **Water**



# Serial Time Points

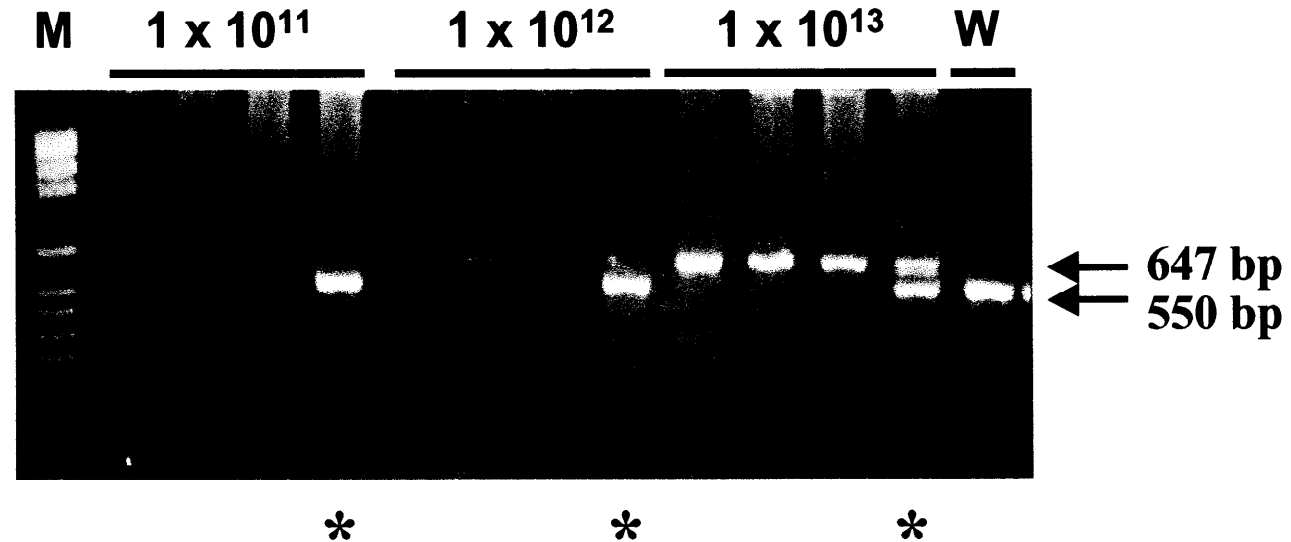
---

## Total Semen Analysis - Experienced Rabbits

TIME POINT							
7	15	22	36	44	50	87	115
1/3	2/3	1/3					
3/3	1/3	2/3	1/3	2/3			

**No. of Positive PCR/ No. of Total Reactions**

# PCR Results from DNA Extracted from Total Semen Fraction Collected 7 Days Following AAV Injection



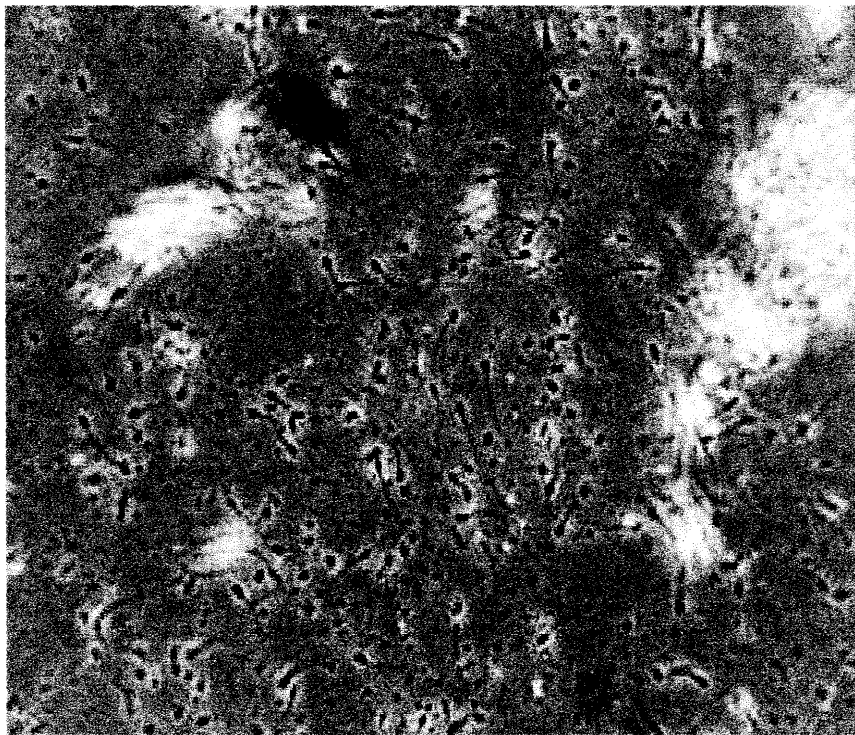
\* spiked with 10 copies plasmid



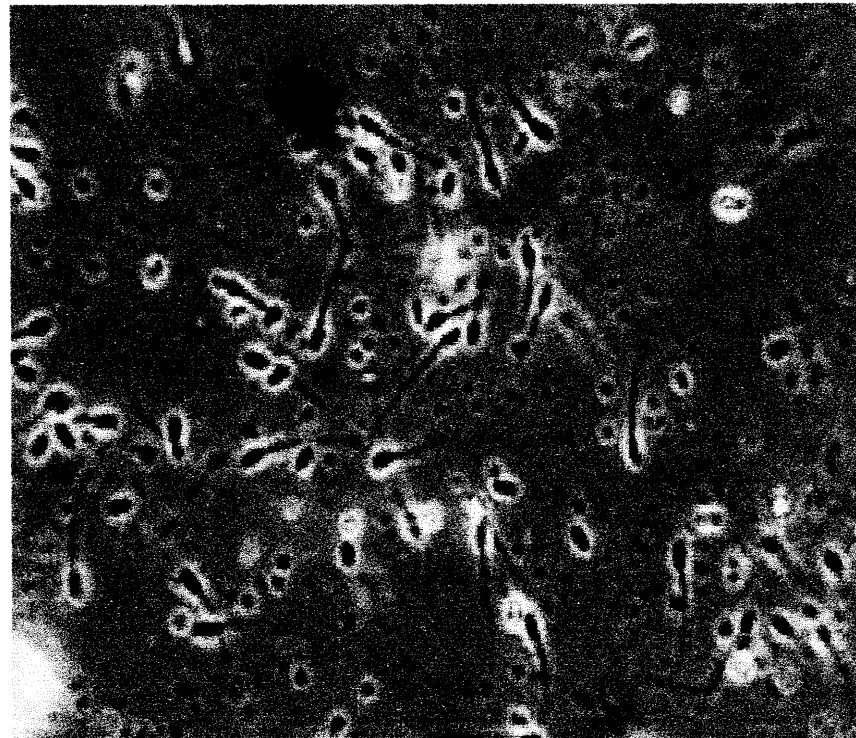
# **Rabbit Semen Fractionation**

- **Optimal fractionation conditions depend on size and shape of sperm and semen pH**
- **Day 7 fractionation utilized parameters worked out for human semen**
- **Microscopic exam→contamination of “motile sperm” fraction with multiple other cell types**

# Analysis of Rabbit Semen Smear Following Fractionation

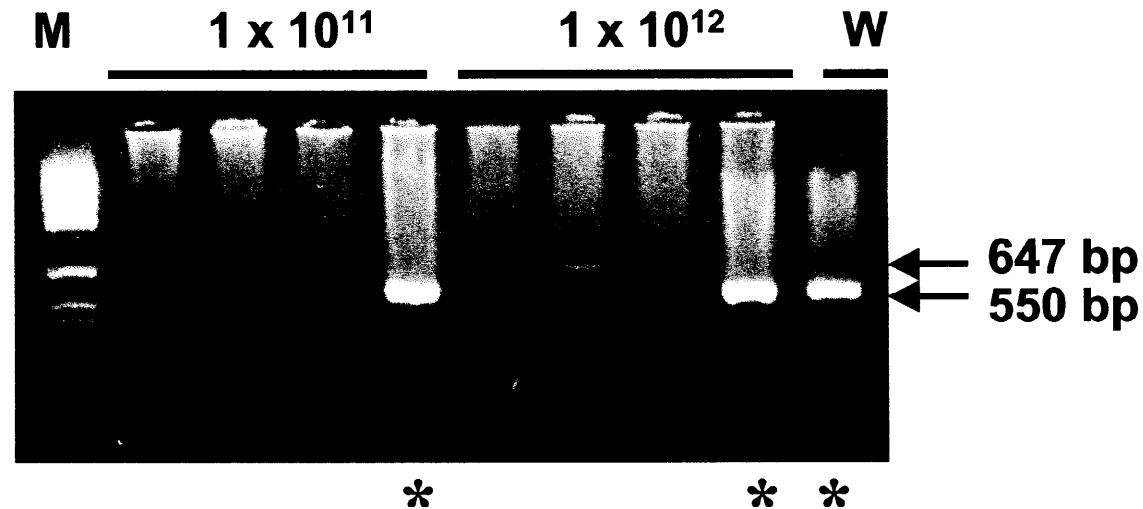


**20 X**



**40X**

# PCR Results from DNA Extracted from Motile Sperm Fraction Collected 7 Days Following IV Injection of AAV-hF.IX Vector in Rabbits



**\* spiked with 10 copies plasmid**

# Comparison Between Human and Rabbit Male Germ Cells

	Humans	Rabbits
Duration of spermatogenesis (days)	74-76	48
Daily Sperm Production x 10 <sup>6</sup> /g of testis	4.4	25
pH	7.2-8	6.6-7.5
Volume of ejaculate (ml)	2-6 (3.5)	0.4-6 (1.0)
comments	much cell debris	debris/gels
Density of Sperm (x 10 <sup>6</sup> / ml)	30-120	~ 250
motile sperm (%)	60-80	60-70
<u>Sperm characteristics:</u>		
Head length	6.1	8.5
Mid-piece length	4.7	8.8
Total length	58.4	58.0

# **Rabbit Semen Fractionation**

- **Specific reagents for rabbit semen fractionation (Nidacon Intl AB®)**
- **Centrifugation speed decreased from 500g to 300g**

# Serial Time Points

## Total Semen Analysis

$\frac{1}{2} \sqrt{2} \sqrt{1 + \sqrt{2}}$																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							</
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

## Motile Sperm Analysis

301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

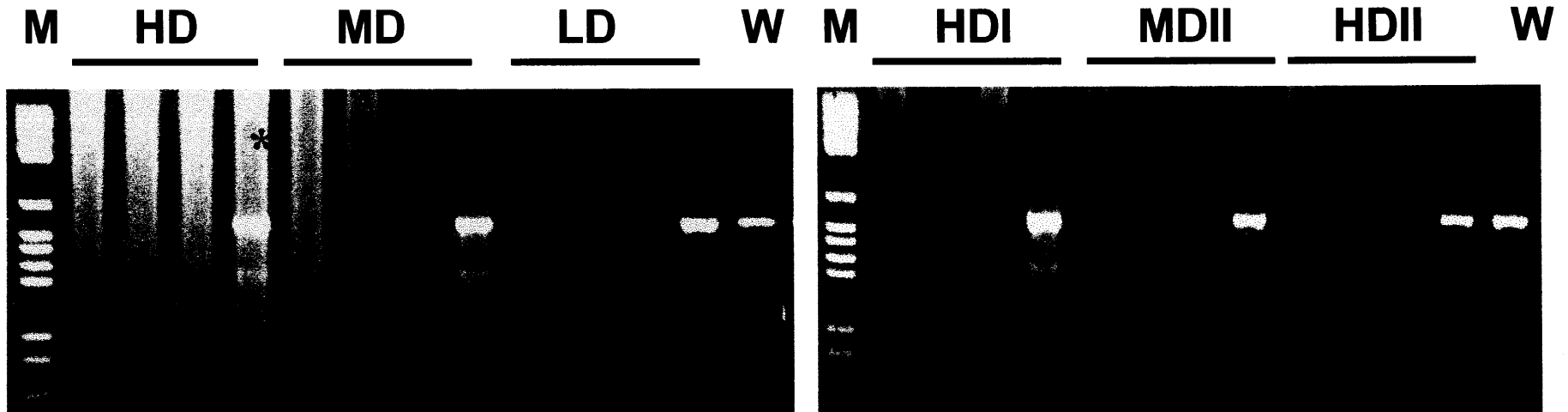
## Non-motile Sperm/Seminal Fluid

401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

NS: no sample

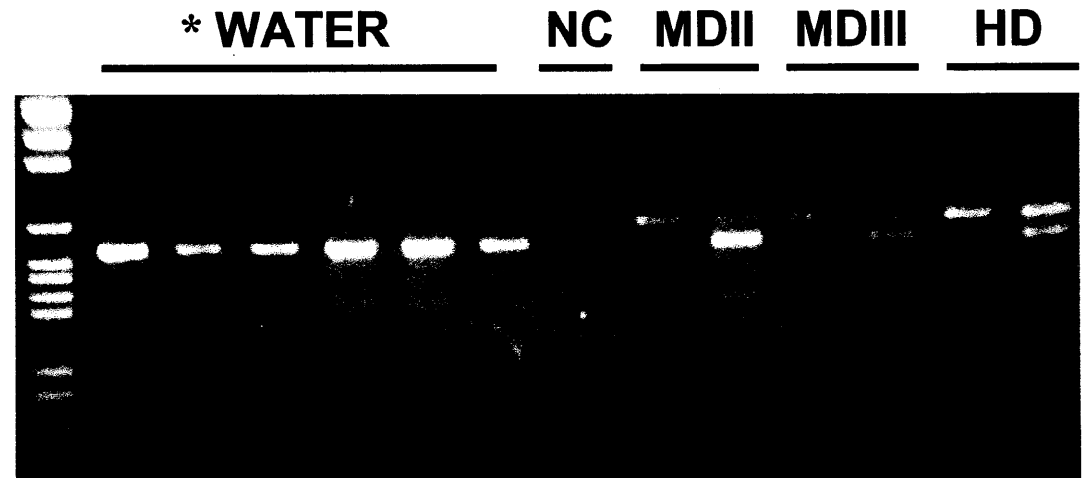
# Total Semen and WBC DNA Analysis

Sample collection 3 months following injection



\* spiked with 10 copies

Pellet of Peripheral  
White Blood Cells

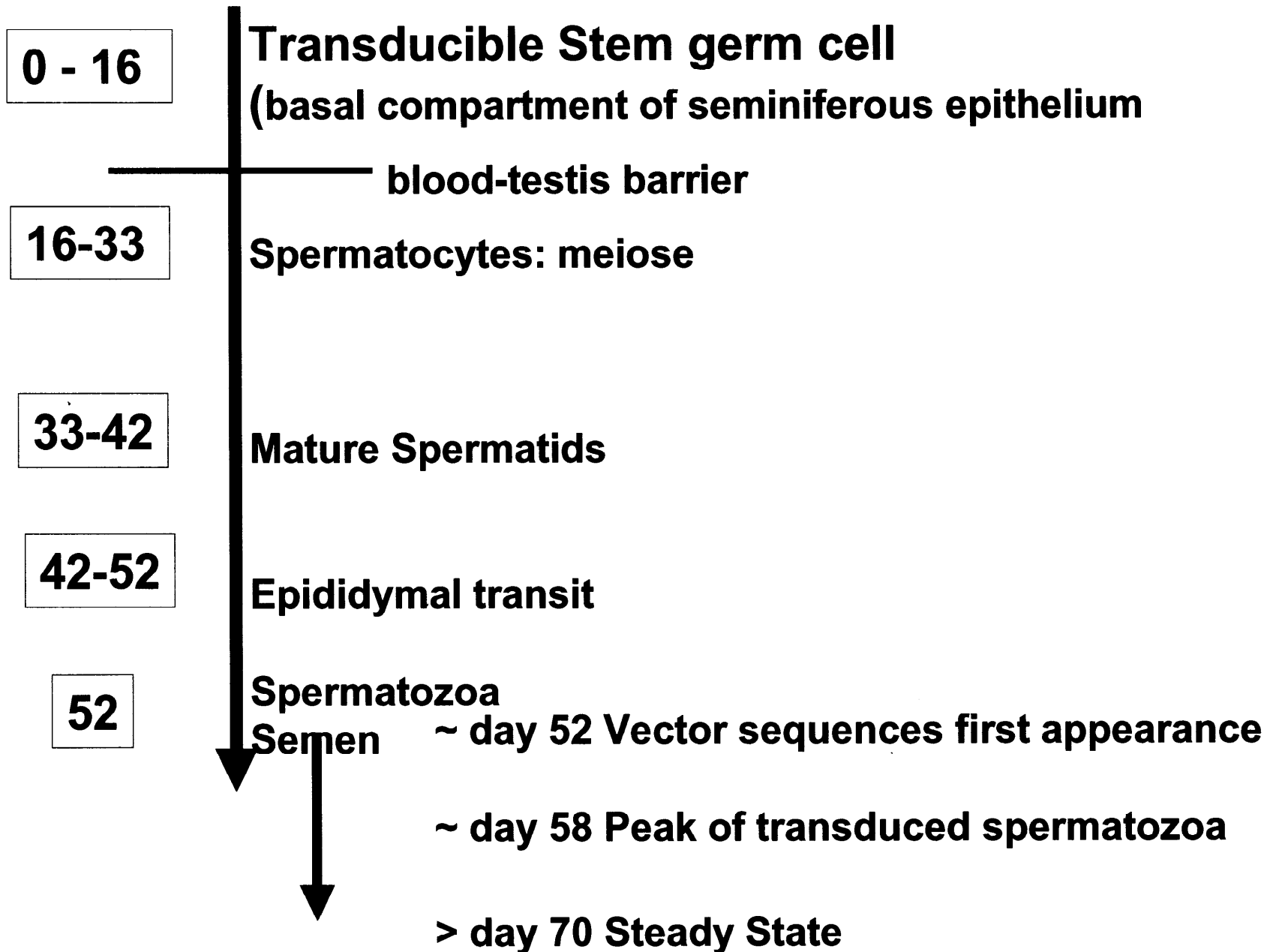


# PCR Results from Semen Analysis- Sexually Mature but Inexperienced

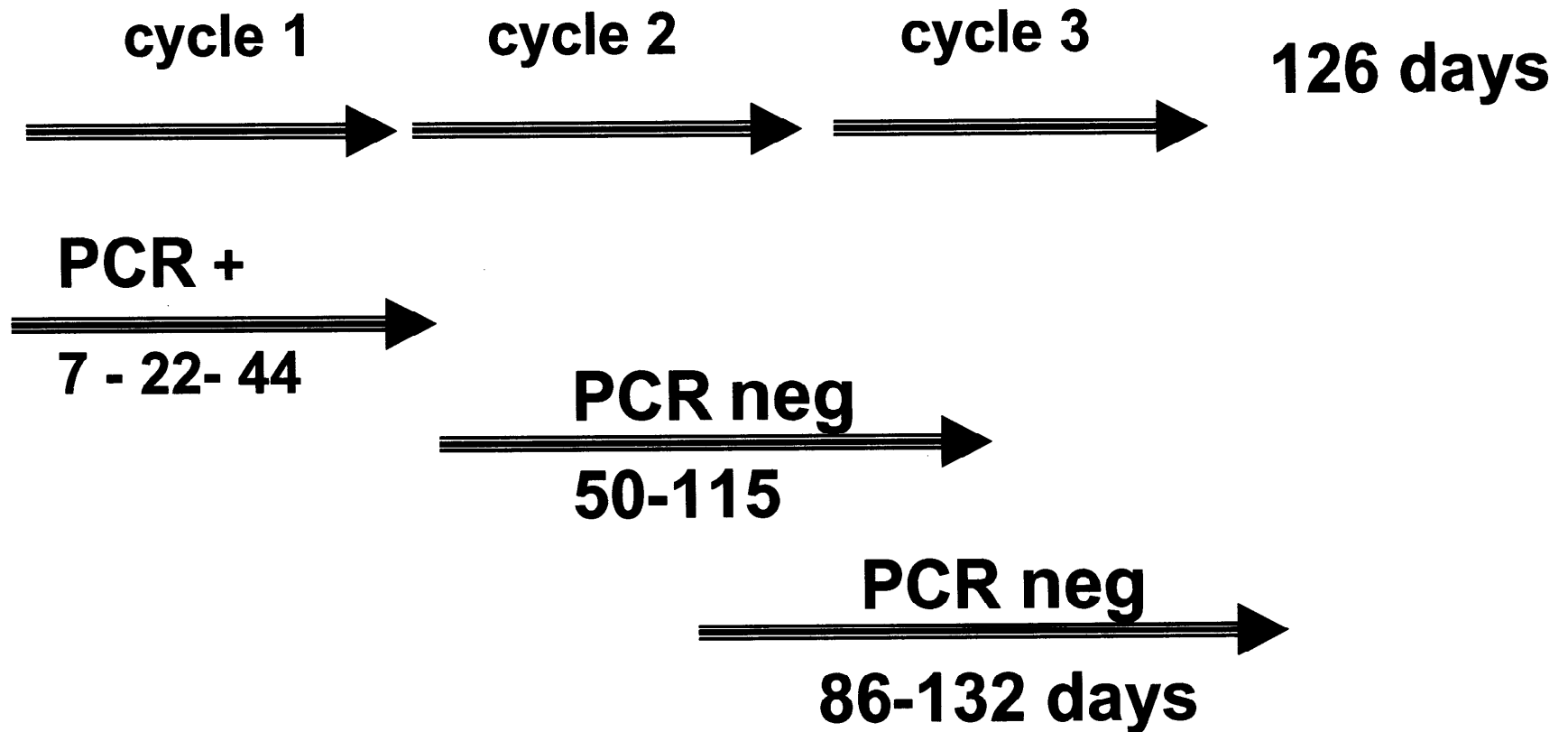
Dose (vg/kg)	Rabbit Sampled (n)	Days 86-118	Days 100-132
0	1	0	0
1	1	0	0
2	1	0	0
3	1	0	0
4	1	0	0
5	1	0	0
6	1	0	0
7	1	0	0
8	1	0	0
9	1	0	0
10	1	0	0
11	1	0	0
12	1	0	0
13	1	0	0
14	1	0	0
15	1	0	0
16	1	0	0
17	1	0	0
18	1	0	0
19	1	0	0
20	1	0	0
21	1	0	0
22	1	0	0
23	1	0	0
24	1	0	0
25	1	0	0
26	1	0	0
27	1	0	0
28	1	0	0
29	1	0	0
30	1	0	0
31	1	0	0
32	1	0	0
33	1	0	0
34	1	0	0
35	1	0	0
36	1	0	0
37	1	0	0
38	1	0	0
39	1	0	0
40	1	0	0
41	1	0	0
42	1	0	0
43	1	0	0
44	1	0	0
45	1	0	0
46	1	0	0
47	1	0	0
48	1	0	0
49	1	0	0
50	1	0	0
51	1	0	0
52	1	0	0
53	1	0	0
54	1	0	0
55	1	0	0
56	1	0	0
57	1	0	0
58	1	0	0
59	1	0	0
60	1	0	0
61	1	0	0
62	1	0	0
63	1	0	0
64	1	0	0
65	1	0	0
66	1	0	0
67	1	0	0
68	1	0	0
69	1	0	0
70	1	0	0
71	1	0	0
72	1	0	0
73	1	0	0
74	1	0	0
75	1	0	0
76	1	0	0
77	1	0	0
78	1	0	0
79	1	0	0
80	1	0	0
81	1	0	0
82	1	0	0
83	1	0	0
84	1	0	0
85	1	0	0
86	1	0	0
87	1	0	0
88	1	0	0
89	1	0	0
90	1	0	0
91	1	0	0
92	1	0	0
93	1	0	0
94	1	0	0
95	1	0	0
96	1	0	0
97	1	0	0
98	1	0	0
99	1	0	0
100	1	0	0



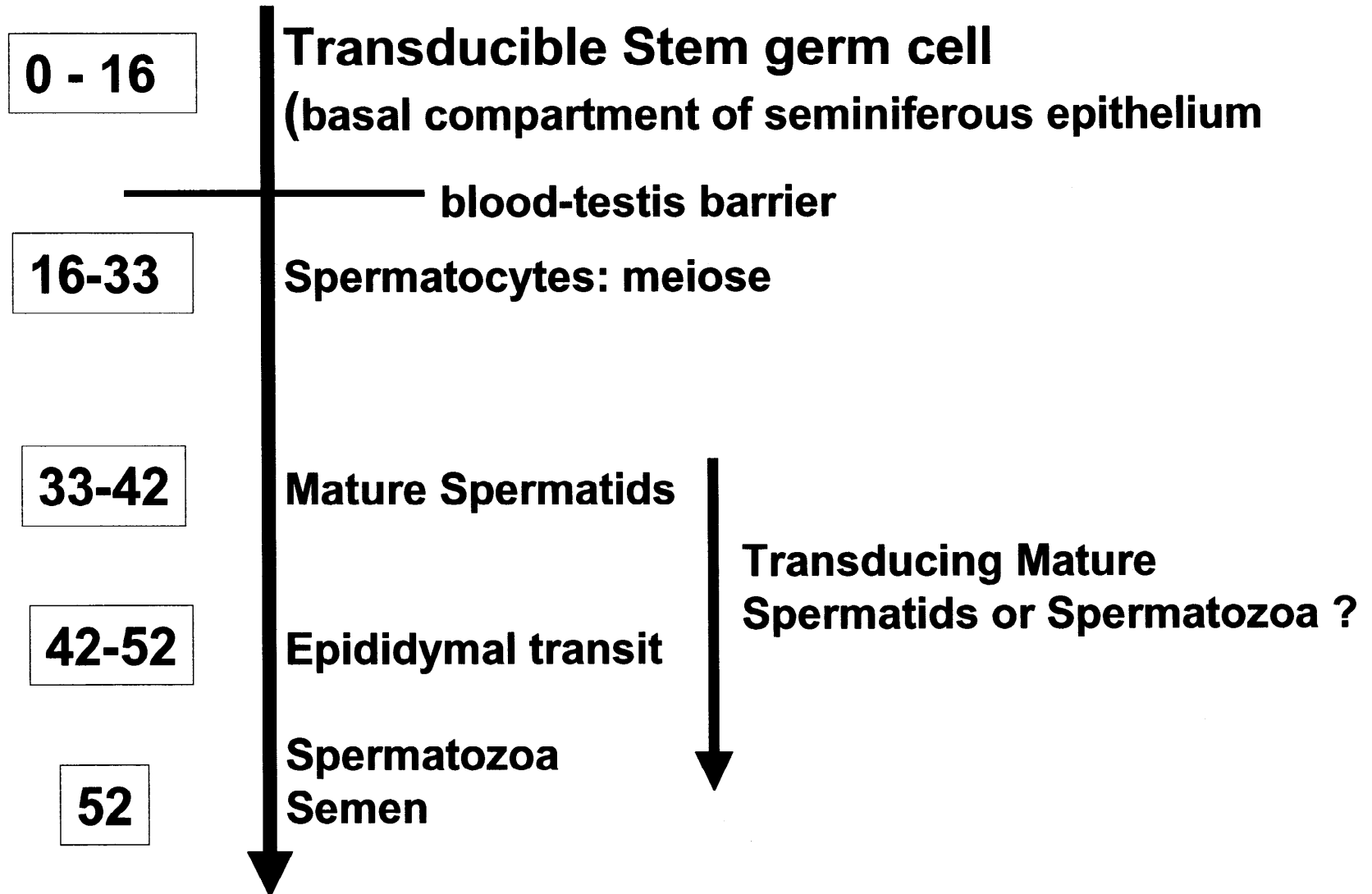
# Rabbit Spermatogenesis



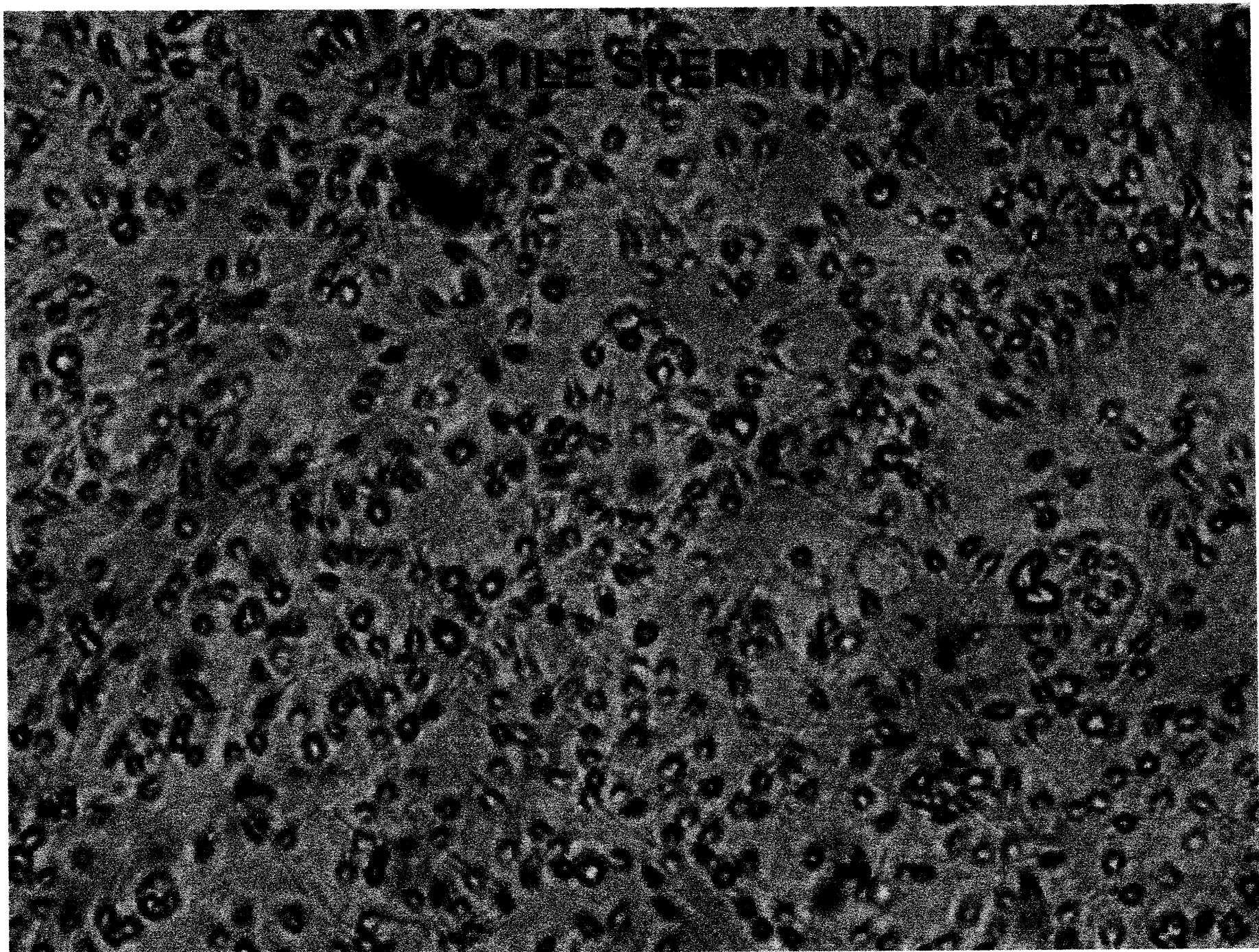
# Rabbit Spermatogenesis



# Rabbit Spermatogenesis



# MOTILE SPERM IN CULTURE



# **“In vitro” Transduction of Motile Sperm by AAV2-CMV-GFP**

**MOI 5,000**

**24 hours**

QuickTime™ and a  
Photo - JPEG decompressor  
are needed to see this picture.



QuickTime™ and a  
Photo - JPEG decompressor  
are needed to see this picture.



# Summary of Gonadal Distribution

Species	Dose	Time(Wk)	Gonads (Vector/Cell)	Semen (Vector/Cell)	Assay Sens.
Rat	$1 \times 10^{11}$	13	negative	nd	1/15,000
	$1 \times 10^{12}$	13	negative	nd	
	$1 \times 10^{13}$	13	1/4300	nd	
Dog	$3.7 - 7 \times 10^{12}$	13	negative	negative	1/30,000
Rabbit	$1 \times 10^{11}$	12	nd	negative	1/30,000
	$1 \times 10^{12}$	1-3	nd	1/30,000*	1/30,000
	$1 \times 10^{13}$	1-6	nd	1/30,000*	1/30,000
Monkey	$7 \times 10^{12}$	19	negative	nd	1/2,500
Human 1	$2 \times 10^{11}$	1-10	nd	1/30,000*	1/30,000
2	$2 \times 10^{11}$	1-12	nd	1/30,000*	1/30,000

\* Estimate based on qualitative assay

nd : not done

**Results in assessing the risk for germline transmission of rAAV2 following intramuscular injection of rabbits at doses of  $1 \times 10^{13}$  vg/kg**

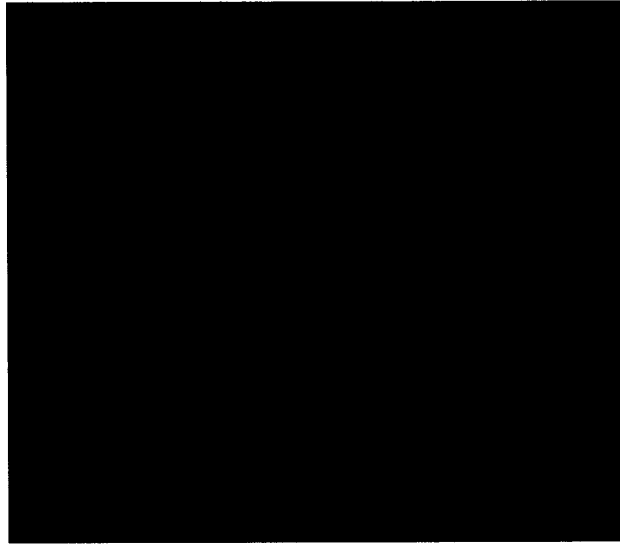
**Immunofluorescence staining and Fluorescent *in situ* hybridization shows that detectable signal is localized to vessel wall and testicular basement membrane, structures rich in HSPG (known receptor for AAV2).**

**The detectable signal disappears with time.**

**No evidence of intracellular signal in testis**

**Mol Ther 4: 586, 2001**

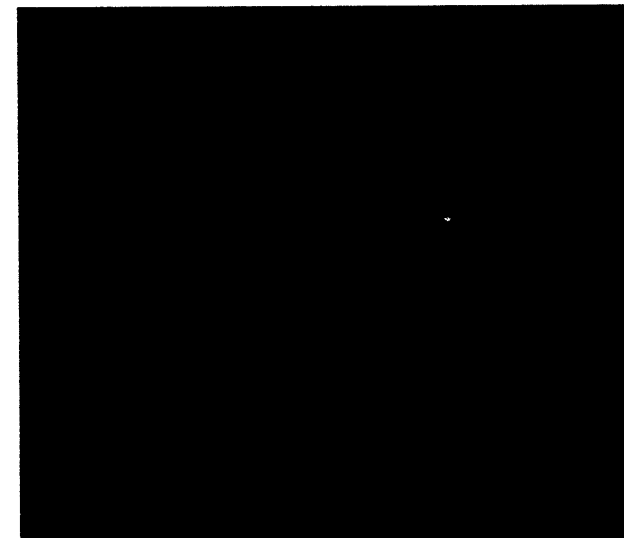
# **IF Staining for AAV Capsid and for Heparan Sulfate Proteoglycan in Testis**



**AAV capsid**



**AAV capsid + HSPG**





## ***In Vitro* Transduction of Human and Murine Cells**

**Human 293 cells, murine fibroblast cell line,  
murine spermatogonia and Sertoli cell co-cultures**

**Transduced with AAV-CMV-lacZ at MOI 5000 and  
stain for X-gal histochemistry**

**Spermatogonia identified by immunostaining  
using Mab to germ cell nuclear antigen**

*a*



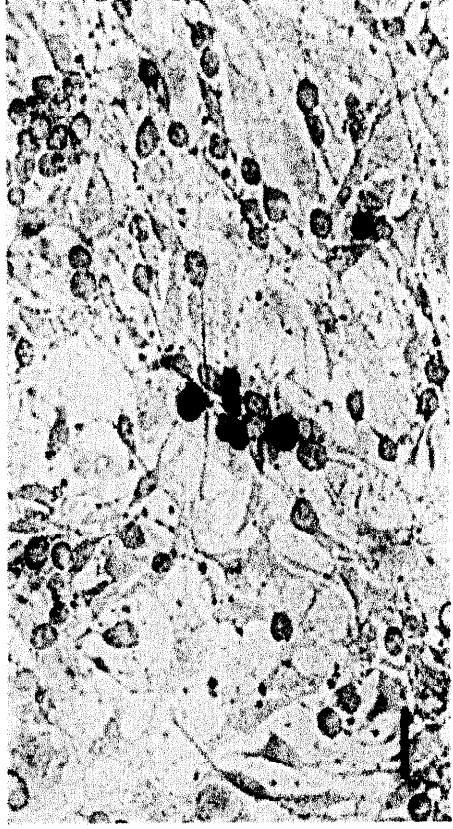
**Human 293 cells**

*b*



**Mouse fibroblast  
cell line (STO)**

*c*



**Mouse spermatogonia  
and Sertoli cells**

# Conclusions

**Intravenous administration of rAAV doses up to  $1 \times 10^{13}$  vg/kg in rabbits results in transient detectable signal in semen in a dose dependent manner**

**PCR positivity of the semen persists up to day 44 (high-dose animal). Follow up for ensuing ~100 days revealed no positive signal (duration of 2 times of the rabbit spermatogenesis)**

**Vector signal can be detected in PMBs for at least 3 months after IV injection in rabbits (in NHP up 8 months after IM injection of vector but not infectious after day 7)**

# **Conclusions**

**Risks to partners and potential offspring can be prevented by use of barrier contraception until semen samples clear, and by sperm banking**

**Although it is prudent to continue studies in animal models, definitive answers to these questions can only be gained from clinical studies. Thus far there have been no other safety issues raised by hepatic artery administration of rAAV, either in animals or humans**

# **Ongoing Experiments**

**Continuous follow up of kinetics of clearing,  
determination of anatomic localization of signal  
as a function of vector dose**

**To determine whether rAAV infectivity is detected in  
rabbit semen samples collected at a series of  
time points**

**To determine whether receptor for AAV-2 is present  
in mice, rabbit, and human spermatozoa**